

Урал – от идеи до лекарства

Р. В. Петров

Дорогие коллеги!

Сегодня у меня приятная задача – в коротком выступлении рассказать о том, что для меня зародилось на Урале и на Урале же воплотилось в жизнь. Речь пойдет о генетическом контроле иммунитета, реакции организма животных и человека на чужеродные агенты, включая бактерии, вирусы и т. д. Я хочу рассказать, как из первых шагов в этом направлении выросла идея обхода генного контроля, идея создания вакцин нового типа. Тема довольно сложная в научном отношении. Но я в своей жизни так много выступал и писал, что уверовал в то, что могу рассказать о своих сложных делах понятно. Мне захотелось рассказать о том, что началось здесь, об одном из направлений научной работы, которую мне посчастливилось вести в течение многих лет. Замысел, идея начались здесь и являются примером того, что называется *«от идеи до продукта»*. Или, как часто говорят у нас, – *«от идеи до лекарства»*. Это редкое счастье, и в жизни каждого из нас бывает не много таких примеров. Да, получались интересные результаты, развивались интересные направления, но чтобы довести до конечной цели, до практически используемой вещи, такое бывает не так часто. Я хочу рассказать вам об одной из таких удач.

Постараюсь за 20 минут рассказать то, что длилось 20 с лишним лет. В 1958 г. я приехал сюда, в Свердловск, в свой отпуск, чтобы найти, познакомиться и пообщаться с Н. В. Тимофеевым-Ресовским, который здесь работал. В университете я его не застал, потому что он уже уехал на свою летнюю базу на биостанцию в Миассово. Я был с двумя товарищами, мы сели на поезд и поехали искать Николая Владимировича.

В те годы иммунология была такой наукой, которая как бы демонстрировала всем, что никакой генетической основы в иммунном реагировании нет. Скажем, человек переболел оспой. У него появились не только оспины. У него в крови появились антитела – белки, которые убивают оспенный вирус. Этот человек больше никогда не заболает оспой. Но у него рождаются дети, которые великолепным образом заражаются и болеют. То есть приобретенное качество невосприимчивости не наследуется. Всех детей мы прививаем полиомиелитной вакциной, они вырастают, не болеют полиомиелитом, потому что у них появились после иммунизации антитела против данного

вируса. Дети вырастут, и у них появятся свои дети. И опять, если их не привить и не создать иммунитет, они могут заразиться полиомиелитом, заболеть и погибнуть. Все это яркие примеры того, что якобы наследственной основы при развитии невосприимчивости нет, никаких генов иммунного ответа не существует. И действительно, в 50-е гг. XX в. никто в мире этой проблемой не занимался. Наследственные иммунодефициты и гены иммунного ответа (IR⁺-гены) еще предстояло открыть.

Я ехал к Тимофееву-Ресовскому, знаменитому генетику, потому что не мог понять, может ли так быть или я не понимаю сути из-за своей генетической неграмотности. Мы – мое студенческое поколение – действительно были генетически неграмотны. Я учился в самый период лысенковизма – в 1947 г. начал, а в 1953 г. закончил свое медицинское образование. Как раз тогда – с 1947 г. – даже учебники по генетике запретили и изъяли. Лысенко царствовал и властвовал. Хрущев в начале своего управления страной в 1954 г. его немножко «придавил», а потом возлюбил. Время было такое, что нам, молодым людям, надо было самим искать генетические тропы.

Когда я приехал в Миассово, то, рассказывая Тимофееву-Ресовскому на семинарах о своих работах, слушая его лекции, уже здесь, на Урале, под его влиянием возник замысел о том, как поискать загадочные генетические основы иммунного ответа.

Мы выбрали несколько разных пород (линий) лабораторных мышей и увидели, что при иммунизации одним и тем же микробом у разных линий возникала разная напряженность иммунитета: у некоторых возникало много антител, у некоторых мало. Мы знаем, что и в общей популяции так же: один человек болеет, другой не болеет; один быстро выздоравливает, другой медленно, то есть количественная основа чем-то определяется. В те годы интенсивно развивалась мышинная генетика. Тем не менее наши публикации о межлинейных различиях иммунного ответа были одними из самых первых.

Мы проиммунизировали несколько генетически разных пород мышей и выбрали альтернативные генотипы: те, которые очень сильно реагировали, и те, которые очень слабо. Иначе говоря, мы выбрали две генетические протоположности. Понимая важность исследований, уже тогда мы публиковали наши результаты в самых высоких научных журналах в нашей стране и за границей. В те годы это было трудно делать, но мы делали. Потом меня стали приглашать на большие генетические конгрессы, работы получили резонанс уже на том этапе.

Что самое интересное?

Допустим, мы выбрали такой генотип, который дает малую выработку антител. Будет ли он низкореагирующим ко всем антигенам, ко всем микробам? Ничего подобного! Выбрали два микроба. Конкретно мы работали с лептоспирами. Одна генетическая порода мышей очень слабо вырабатывает иммунитет, а другая очень сильно. Взяли другой микроб, картина обратная, т. е. первый генотип не является слабым ко всему, а второй – сильным ко всему.

Уже в самом начале 60-х гг. в опытах с лептоспирами было установлено, что животные разных генотипов вырабатывают неодинаковое количество антител с 20 и более кратными различиями между оппозитными линиями. При иммунизации животных другими антигенами (бычий γ -глобулин, эритроциты барана, α -анатоксины возбудителей газовой гангрены и столбняка) каждая из использованных линий продуцировала различное количество антител, зависящее от применяемого антигена. При этом одна генетическая линия животных могла быть высокореагирующей на один антиген и низкореагирующей на другой, и наоборот. Межлинейные различия сохранялись на протяжении жизни животных и не исчезли при радиационном угнетении антителогенеза, хотя и регистрировались на значительно более низком уровне по сравнению с необлученными мышами. Оппозитный тип реагирования к ряду антигенов обнаружен и исследован у человека. На основании полученных данных была сформулирована важнейшая иммуногенетическая закономерность об отсутствии некоей «общей иммунологической реактивности». У каждого есть свои сильные стороны и своя «ахиллесова пята». Иммунологическая реактивность конкретна, ее проявление определяется генетически детерминированными свойствами организма и используемого антигенного материала.

Проведенный группой моих сотрудников гибридологический анализ показал, что признак силы иммунного ответа наследуется по доминантному типу. Во втором поколении происходит менделевское расщепление признака. Продукция антител к бактериальным антигенам контролируется более чем одним геном. Это были первые в мире сведения о наличии генов иммунного ответа к бактериальным антигенам.

В связи с полученными данными возникла важнейшая задача – определение уровня генетического контроля. Реализуется ли он на организменном уровне или на уровне клеточных популяций, содержащих иммунокомпетентные клетки? Для этих целей был использован метод «культуры *in vivo*» с применением летально облученных реципиентов, представляющих собой, по сути дела, пробирку с полноценной питательной средой для пересаживаемых иммуноцитов.

Оказалось, что в такой культуре регистрируются те же иммуногенетические закономерности выработки антител, что и на уровне целого организма. Это позволило сделать вывод о том, что фенотипическое проявление генетического контроля иммунологической реактивности реализуется на уровне популяции лимфоидных клеток.

Напомню, что все лимфоциты нашего тела делятся на две большие группы – Т-лимфоциты, возникающие в тимусе, и В-лимфоциты, возникающие в костном мозге. Так вот, именно Т-лимфоциты являются главными «исполнителями» программы генного контроля.

Вся наша группа, а в ней в это время работали Рахим Хаитов, Виктор Манько и другие, осмыслила, что каждое млекопитающее, включая человека, генетически состоит из некоего набора генов, которые определяют сильную реакцию на один антиген и слабую на другой. Это уже само по себе ошеломило, но мы не только проводили исследования в этом направлении. Мы вынашивали идею, как обойти генный контроль. Вырос коллектив, потом удалось организовать институт, и это было одним из основных направлений. Как найти способ, чтобы слабо реагирующие генотипы, слабо реагирующие особи заставить реагировать сильно на тот антиген, против которого мы хотим создать иммунитет. Заставить по отношению к данному микробу, вирусу, антигену обеспечить то, что называется фенотипической коррекцией. Несмотря на генетически обусловленную слабую реакцию, заставить реагировать сильно. Из этого мы сделали свой принцип поиска новых средств для того, чтобы создать новые лекарства, стимулирующие иммунитет, создать вакцины нового типа, которые бы давали иммунный ответ даже у тех, которые по своей природе не могут так реагировать.

В эти годы я сдружился с Виктором Александровичем Кабановым, в то время еще не академиком, и мы начали вести поиск среди полимерных соединений, а более конкретно – среди высокомолекулярных полиэлектролитов. Тогда в медицине интересовались полимерами только как нейтральными продуктами, чтобы сделать искусственный клапан сердца, искусственный сустав, кровезаменитель и т. п. Это великое дело, и на этом пути огромные достижения. Вся сила полимерной химии, применительно к медицине, была направлена на то, чтобы делать нейтральные продукты, которые бы ни с чем не взаимодействовали. А мы с В. А. Кабановым фактически начали другую линию. И гордимся этим нашим пионерским начинанием. Мы стали искать такие полимеры, которые бы взаимодействовали с клетками, чтобы у них была возможность подействовать на поверхностные

клеточные структуры, на мембранные белки, за счет имеющейся у полиэлектролитов способности к многоточечным обратимым кооперативным связям. На этом пути мы нашли группу перспективных веществ. Мы стали делать комплексы этих полимеров с интересующими нас антигенами.

Длительные исследования установили, что химическое соединение полиэлектролита с антигеном позволяет концентрировать иммуностимулирующее действие полиэлектролита на антиген-реактивных клетках и включает В-лимфоцит без помощи Т-лимфоцита. Введение ковалентных конъюгатов антиген-полиэлектролит в организм животных и человека индуцирует иммунный ответ на антиген, значительно более интенсивный, чем ответ на введение антигена или нековалентного комплекса [антиген + полиэлектролит].

Первый конъюгированный иммуноген был создан нашей группой в 1977 г. Он состоял из гаптена тринитрофенила и поли-2-метил-5-винилпиридина. Этот конъюгат вызывал продукцию антител, специфичных к тринитрофенилу, без дополнительных адъювантов. Следовательно, несмотря на простоту структуры конъюгата, в нем содержалось все, что необходимо для иммуногена – антигенная детерминанта и стимулятор реакции иммунной системы на эту детерминанту.

Последующие работы, совместные с В. А. Кабановым, Р. М. Хаитовым, А. В. Некрасовым и соавторами показали, что конъюгированные иммуногены можно создавать, используя белковые и полисахаридные антигены, а также синтетические пептиды, имитирующие природные антигенные детерминанты. Были исследованы конъюгаты как с модельными, так и с антигенами микроорганизмов. Путем ковалентного соединения антигена с полиэлектролитом были созданы высокоиммуногенные конъюгаты, содержащие О- и Н-антигены возбудителей тифа, гемагглютинин и нейраминидазу вирусов гриппа А и В, гликопротеиновый антиген бруцелл, очищенный белковый компонент туберкулина и др.

Среди важнейших особенностей иммунного ответа на конъюгированные иммуногены необходимо выделить их высокую Т- и ИР-независимость. Под влиянием полиэлектролитов происходит стимуляция продукции антител даже в организме, дефицитном по содержанию Т-клеток. Полноценный иммунный ответ на конъюгат антиген-полиэлектролит развивается также и в организме, имеющем ИР-гены слабой иммунной реакции на данный антиген. Благодаря Т- и ИР-независимости конъюгированные иммуногены очень перспективны в реальной практике, так как вызывают эффективный иммунный ответ

при Т-иммунодефиците и при генетически предопределенной слабой способности реагирования на данный антиген. Обычные вакцины в таких случаях неэффективны.

В прямых экспериментах по заражению животных различными возбудителями инфекций было установлено, что конъюгированные иммуногены способны защищать от летальных доз инфекций. Конъюгированные иммуногены, содержащие гемагглютинин и нейраминидазу вируса гриппа, химически связанные с полиэлектролитом-иммуностимулятором, индуцировали высокий уровень защиты при заражении мышей патогенным для них штаммом вируса гриппа в десяти смертельных дозах.

В модели экспериментального заражения мышей вирусом гриппа было установлено, что даже конъюгаты, содержащие в качестве антигенной части М-белок вируса гриппа, защищают в определенной мере от заражения патогенным вирусом. Ранее считалось, что иммунные реакции, специфичные в отношении М-белка, не играют существенной роли в защите от гриппозной инфекции.

Исследование протективных свойств конъюгированных иммуногенов, содержащих О- и Н-антигены возбудителей брюшного тифа, тоже показало высокий уровень вакцинирующего (защитного) действия конъюгатов. В модели естественной для мышей инфекции *Salmonella typhimurium* было показано, что в составе конъюгата с полиэлектролитом протективная эффективность полисахаридного О-антигена сальмонелл возрастает в 20–40 раз. Используя конъюгат О-антигена (или двух антигенов О+Н) с полиэлектролитом, можно было защитить мышей от заражения в 100 абсолютно смертельных дозах *Salmonella typhimurium*.

После всех этих мышинных экспериментов нами была предпринята специальная работа по созданию синтетического полимера-иммуностимулятора, отвечающего требованиям к фармакологическим препаратам. От других полиэлектролитов такой препарат должен отличаться безвредностью, способностью к деградации и выведению из организма. Решая эти задачи, было необходимо сохранить способность полимера к многоточечным кооперативным взаимодействиям, с которой и связана иммуностимулирующая активность полиэлектролитов. В 1990 г. А. В. Некрасовым синтезирован биодеструктурируемый полимер, отвечающий сформулированным выше требованиям – это сополимер N-окиси 1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиний бромида, впоследствии названный «Полиоксидоний» (ПО).

ПО запатентован с приоритетом 1990 г. Степень полимерности ПО

соответствует длине полимерной цепи, необходимой для осуществления ключевого события – кластеризации белков в мембране клеток иммунной системы. Множество повторяющихся дипольных NO-групп обеспечивает высокую способность к многоточечным кооперативным взаимодействиям. Карбоксиэтильные группы приносят дополнительные адсорбционные свойства, а главное, служат универсальными сайтами для химического присоединения к любому антигену.

Разработка ряда конъюгированных вакцин находится на разных стадиях. Полностью завершена и внедрена в практику здравоохранения конъюгированная вакцина против гриппа A1, A2 и B, завершены клинические испытания бруцеллезной вакцины, завершены доклинические испытания брюшнотифозной вакцины, проводятся доклинические испытания вакцины против туберкулеза.

Вакцина против гриппа известна под названием «Гриппол». Государственные испытания вакцины «Гриппол» (Государственный институт стандартизации и контроля им. Тарасевича МЗ РФ) подтвердили ее высокую профилактическую эффективность и полную безвредность.

Наиболее важные характеристики вакцины «Гриппол»: индекс эффективности – 3,4, коэффициент профилактической эффективности – 77 %. В результате вакцинации «Грипполом» в 2,4 раза снижается также частота острых респираторных заболеваний. Эффективность «Гриппола» выше традиционных вакцин, не уступает наиболее современным импортным вакцинам при существенно более низкой антигенной нагрузке и в несколько раз более низкой цене. Для эффективной защиты достаточно однократного введения вакцины «Гриппол», осложнений при ее применении не зарегистрировано, ограничений по возрасту прививаемых нет.

Гриппозная полимер-субъединичная тривалентная вакцина «Гриппол» разрешена к применению и промышленному выпуску Приказом Минздрава России в 1996 г. Вакцина включена в Перечень вакцин для обязательной вакцинопрофилактики. Промышленный выпуск вакцины «Гриппол» осуществляется с 1997 г. Уфимским ГУП «Иммунопрепарат» – крупнейшим в России предприятием по производству высококачественных иммунобиологических препаратов и лекарственных средств. Привито уже более 7 млн человек. Стоп, предприятие Уфимское, т. е. я снова попал на Урал. Хочу сказать ему спасибо. Именно на Урале родилась и реализовалась редкая для исследователя удача: *От идеи до лекарства.*

* Immune response – иммунный ответ.